



**Universidad
Zaragoza**

INFLUENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE MELATONINA COMO SUSTANCIA QUIMIOTÁCTICA EN LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Memoria presentada por la alumna Sonia Borao Arriazu para optar al título de
Graduada en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por:

Adriana Casao Gascón

José Álvaro Cebrián Pérez

Trabajo realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Veterinaria





Universidad
Zaragoza



La Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctor y el
Dr. José Álvaro Cebrián Pérez, Catedrático del Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de
Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Sonia Borao Arriazu, ha realizado bajo nuestra
dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin
de Grado titulado "Influencia de distintas dosis de melatonina como
sustancia quimiotáctica en la selección espermática". Este trabajo
cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en
Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en
Zaragoza a 17 de Septiembre de 2015.

Adriana Casao Gascón

José Álvaro Cebrián Pérez

ÍNDICE:

Página:

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. La melatonina como regulador de la reproducción estacional.	3
2.2. La melatonina en la reproducción ovina.....	3
2.3. La melatonina en el espermatozoide ovino.....	4
2.4. La melatonina como sustancia quimiotáctica.....	5
2.5. Fecundación y quimiotaxis.....	5
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Recolección de semen.	8
4.2. Selección espermática por el método de swim-up/dextrano.	8
4.3. Concentración y porcentaje de recogida.	9
4.4. Evaluación de la motilidad espermática.	10
4.5. Determinación de la viabilidad.	10
4.6. Evaluación del estado de apoptosis.....	11
4.7. Evaluación del estado de capacitación.	12
4.8. Determinación de la distribución del receptor MT ₂ de melatonina por inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	13
4.9. Análisis estadístico.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. ESTACIÓN REPRODUCTIVA (Octubre - Febrero)	15
5.1.1. Concentración y porcentaje de recogida.	15
5.1.2. Evaluación de la motilidad espermática.....	15
5.1.3. Determinación de la viabilidad.....	16
5.1.4. Evaluación del estado de apoptosis.	16
5.1.5. Evaluación del estado de capacitación.....	17
5.2. ESTACIÓN NO REPRODUCTIVA (Abril - Junio)	18
5.2.1. Concentración y porcentaje de recogida.	18
5.2.2. Evaluación de la motilidad espermática.....	19
5.2.3. Determinación de la viabilidad.....	19
5.2.4. Evaluación del estado de apoptosis.	19
5.2.5. Evaluación del estado de capacitación.....	20
5.2.6. Determinación de la distribución del receptor MT ₂ de melatonina por inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	21
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23

1. RESUMEN

La quimiotaxis es un proceso esencial para la unión del espermatozoide al ovocito. Dentro del tracto reproductor femenino, el espermatozoide dispone de varios mecanismos para orientarse y uno de estos mecanismos es la quimiotaxis, aunque las sustancias que regulan este proceso todavía no son muy conocidas. El efecto quimiotáctico de la melatonina no solo se ha demostrado en células del sistema inmune, sino que además, es una hormona esencial en la regulación de la reproducción ovina. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es analizar el papel de la melatonina sobre los espermatozoides ovinos, determinando su capacidad quimioatrayente, su influencia sobre la calidad espermática y si su papel modulador puede estar condicionado por la estacionalidad reproductiva.

Para ello se evaluó el efecto quimiotáctico de dos dosis de melatonina (alta: 1 μ M y baja: 100 pM) que previamente habían demostrado tener acción antiapoptótica y moduladora de la capacitación en el espermatozoide ovino, sobre un proceso de selección espermática *in vitro* mediante swim-up dextrano, adicionando la hormona en la capa superior de recogida. Tras el proceso de selección, la capacidad quimioatrayente de la melatonina se determinó calculando la concentración y el porcentaje de espermatozoides recogidos de la muestra seleccionada. Además, se evaluó la calidad espermática de las muestras recogidas. Estos estudios se realizaron en estación reproductiva (Octubre – Febrero) y no reproductiva (Abril – Junio).

No se observaron efectos quimiotácticos de la melatonina ni diferencias significativas en ninguno de los parámetros de calidad seminal en los experimentos realizados durante la estación reproductiva, lo que podría atribuirse a la alta concentración de melatonina en el plasma seminal ovino en esta época, que enmascararía el efecto de la melatonina añadida *in vitro*. Sin embargo, en la estación no reproductiva, el porcentaje de recogida fue mayor en los swim-up con melatonina en el medio de recogida ($P < 0,05$) que en el control. Además, se observaron diferencias en el estado de capacitación, donde se observó un aumento de espermatozoides capacitados y una disminución de los no capacitados en las muestras con la concentración baja de melatonina ($P < 0,05$). Estos resultados indicarían que la melatonina presenta un efecto quimioatrayente sobre los espermatozoides ovinos, observable *in vitro* solo en época reproductiva, además de incrementar la calidad espermática.

ABSTRACT

Chemotaxis is an essential mechanism for the sperm-oocyte binding. Inside the female reproductive tract, spermatozoa have orientation mechanisms, and one of those is chemotaxis. The chemotactic effect of the hormone melatonin was previously proved in immune system cells and it has an essential role in ovine reproduction. Therefore, the main aim of this project is to study the chemoattractant ability of melatonin in spermatozoa and to determine whether the sperm quality is increased in the presence of melatonin. In addition, we want to evaluate if sperm interaction with melatonin is affected by the season in which the samples are collected.

In this project, we evaluated the effect of two doses of melatonin: higher (1 μ M) and lower (100pM), during the *in vitro* process of sperm selection, which have been proved an antiapoptotic and modulating effect on capacitation in ovine spermatozoa. After selection process the chemotactic effect of melatonin was assessed by studying sperm concentration and collected rate in selected samples. Furthermore, sperm quality in recovered samples was determined. These studies were performed during breeding-season (October – February) and non-breeding season (April – June).

No significant differences were observed during the breeding season (October – February) in the studied parameters. However, during the non-breeding season (April – Jun), we obtained significant differences in sperm capacitation. A higher percentage of capacitated sperm ($P < 0.05$) were found in the samples with the lower concentration of melatonin. The percentage of collected spermatozoa during the swim-up was higher in the samples with melatonin. These results indicate an improvement in the sperm quality in presence of melatonin and a certain chemotactic effect of the hormone in spermatozoa.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La melatonina como regulador de la reproducción estacional.

La melatonina es una hormona presente en todos los tipos de organismos, junto con los que ha evolucionado funcionalmente a lo largo del tiempo para desempeñar múltiples funciones (Reiter et al. 2013). En la mayoría de los vertebrados, esta hormona es secretada a la circulación sanguínea por la glándula pineal durante la noche. Esta melatonina (Figura 2.1) se sintetiza a partir del aminoácido triptófano (TRP), que es procesado por la enzima triptófano hidroxilasa (TH), pasando a 5-hidroxitriptófano (5HTP); este a su vez, es transformado en serotonina por la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (5HTPD). La serotonina es acetilada por la enzima N-acetiltransferasa (NAT), y por último la hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT, ahora llamada ASMT) cataliza el último paso de la formación de la melatonina (Boutin et al. 2005).

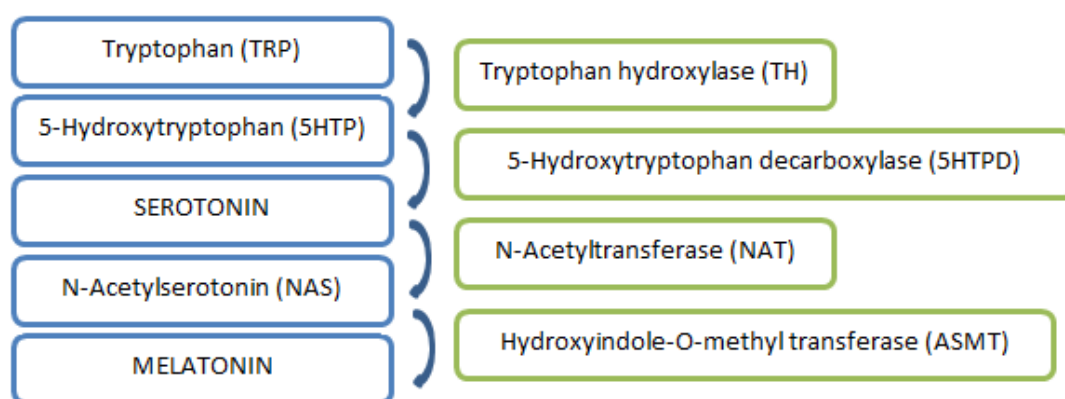


Figura. 2.1. Ruta enzimática de la síntesis de melatonina en la glándula pineal.

La secreción nocturna de melatonina, regulada de forma precisa, proporciona información del momento del día a los organismos. Además, bajo las condiciones naturales del fotoperiodo, los niveles de melatonina liberada durante la noche también varían a lo largo del año, debido a que la duración de esta no es continua entre las diferentes estaciones.

En su mayor parte, el objetivo de la reproducción estacional es regular el momento de nacimiento de las crías, que ocurre principalmente en primavera. En función de la duración del periodo de gestación, cada especie sitúa su estación reproductiva en un momento u otro del año, para asegurar que el parto ocurre en el momento óptimo para la supervivencia de las crías (Reiter et al. 1993). De esta forma, una de las principales funciones de la melatonina sería su papel en la regulación del fotoperiodo en especies estacionales, entre las que se incluye la ovina.

2.2. La melatonina en la reproducción ovina.

La melatonina secretada durante la noche puede inhibir o estimular la reproducción en especies reproductoras de día largo o de día corto, respectivamente (Malpoux et al. 1999). La especie ovina es una especie de día corto, de forma que el aumento de la secreción de melatonina nocturna durante los meses de otoño e invierno tiene un efecto estimulador en su reproducción (Rosa and Bryant 2003).

En las especies de día corto, la luz percibida por la retina es transformada en una señal endocrina por la glándula pineal, mediante el aumento de los niveles de secreción de melatonina nocturna. La

duración de la liberación nocturna de esta hormona regula a su vez la secreción de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) por el hipotálamo, y que a su vez produce cambios en la secreción de la hormona LH (hormona luteinizante), responsable de la actividad ovárica en la hembra y de la producción espermática en el macho (Malpaux et al. 1997, 1999; Misztal et al. 2002).

Aunque la estacionalidad es bastante marcada en la hembra ovina, la producción de esperma es continua en el morueco durante todo el año; sin embargo, durante la estación no reproductiva se observa un descenso de la libido, así como de la calidad espermática y del peso y volumen de los testículos (Karagiannidis et al. 2000; Avdi et al. 2004). Esto se ha asociado a la baja liberación de melatonina por la glándula pineal durante la estación no reproductiva (primavera y verano) (Sheikheldin et al. 1992). De hecho, el tratamiento con melatonina exógena de los moruecos durante la estación no reproductiva no solamente es capaz de revertir los niveles hormonales a niveles propios de la estación reproductiva (Kokolis et al. 2000), sino que también produce una mejora de la calidad espermática (Kaya et al. 2000) y la fertilidad (Palacín et al. 2008).

Estos cambios en los niveles hormonales del morueco tienen su reflejo en el plasma seminal, de forma que en estación reproductiva se encuentran altos niveles de melatonina, testosterona y enzimas antioxidantes en este fluido, mientras que estos niveles son bajos en estación no reproductiva (Casao et al. 2010c). Además, la presencia de melatonina en el plasma seminal también sugiere una acción directa de la melatonina sobre los espermatozoides.

2.3. La melatonina en el espermatozoide ovino.

Hay bastantes estudios que muestran el efecto beneficioso que la melatonina ejerce sobre los espermatozoides *in vitro*, y que se relacionan con su capacidad antioxidante. Así, el tratamiento *in vitro* con melatonina produce un descenso del daño oxidativo de los espermatozoides y del nivel intracelular de ROS y NO (especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, respectivamente) (Rao and Gangadharan 2008); una disminución de la peroxidación de la membrana lipídica (Gadella et al. 2008); así como una disminución de los marcadores de apoptosis (Casao et al. 2010b) y de la fragmentación del DNA (Sarabia et al. 2009).

Por su parte, la melatonina presente en el plasma seminal podría estar actuando como antioxidante en este fluido eliminando las especies reactivas de oxígeno que podrían dañar a los espermatozoides tras la eyaculación (Agarwal et al. 2003). También actuaría ejerciendo un efecto positivo en la actividad de las enzimas antioxidantes, como glutathion peroxidasa y glutathion reductasa (Casao et al. 2013). Este papel antioxidante de la melatonina es uno de los más antiguos, puesto que ya existía en los organismos unicelulares primitivos, y no se ha visto desplazado por las nuevas funciones de esta hormona (Tan et al. 2010).

Aparte de su papel antioxidante, varios estudios han demostrado que el tratamiento con melatonina exógena en moruecos durante la estación no reproductiva produce una mejora en diversos parámetros de calidad espermática, como la motilidad y parámetros testiculares (Casao et al. 2010a). También se ha visto que niveles altos de melatonina endógena se traducen en un aumento de la calidad espermática en humanos. (Ortiz et al. 2011).

La melatonina también parece modular la capacitación espermática en el morueco, actuando como sustancia capacitante o descapacitante en función de su concentración (Casao et al. 2010b).

El mecanismo de acción de la melatonina es complejo, y algunas de sus acciones en mamíferos están mediadas por unos receptores que pertenecen a la superfamilia GPCR (G-protein-coupled receptors), el MT₁ y MT₂ (Dubocovich et al. 2009). Estos receptores se han localizado tanto en tejido

epididimario (Shiu et al. 1997), como en células de Leydig de rata y humano (Sirotkin and Schaeffer 1997), lo que indica un efecto directo de la melatonina en la producción espermática u hormonal del testículo (van Vuuren et al. 1992).

Además, un estudio realizado por Casao et al. (2012a) confirmó la presencia de ambos receptores para melatonina en los espermatozoides ovinos, sugiriéndose que el efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática ovina parece estar mediado por estos receptores (González-Arto, 2014).

2.4. La melatonina como sustancia quimiotáctica.

Estudios *in vitro* en diversas células somáticas y tumorales han demostrado el papel de la melatonina como sustancia quimiotáctica y sus efectos en la motilidad celular, donde la quimiotaxis es clave. En el caso de los neutrófilos, estos aumentan su índice quimiotáctico cuando son expuestos *in vitro* a un gradiente de concentraciones de melatonina entre 40 μ M y 1.2 pM (Peña et al. 2007), mientras que en células epiteliales de retina de pollo, el rango en el que la melatonina ejerció su efecto quimiotáctico fue de entre 100 nM-100 μ M (Shirakawa et al. 1987).

In vivo también se ha observado el efecto quimiotáctico de la melatonina al inyectar una solución de esta sustancia, a una concentración fisiológica (1nM), intraperitonealmente en ratas. Se pudo comprobar que la melatonina induce un aumento del número de leucocitos en la cavidad peritoneal, debido a los efectos quimiotácticos que produce en estas células. (Peña et al. 2007).

La melatonina endógena también jugaría un papel importante como sustancia quimioatrayente, puesto que no solo se ha identificado en la glándula pineal, sino en otros tejidos extrapineales, incluido el fluido folicular (Brzezinski et al. 1987), que puede pasar al oviducto, donde tiene lugar la fecundación, tras la ovulación. Teniendo en cuenta la cantidad de funciones que lleva a cabo esta molécula, y que se puede considerar como una señal paracrina clave para la coordinación de las relaciones intercelulares. (Kvetnoy et al. 2002), es posible que sea una de las moléculas que intervengan en el proceso de unión del ovocito y el espermatozoide.

2.5. Fecundación y quimiotaxis.

En el caso de los mamíferos, la orientación espermática se considera esencial para que lleguen con éxito al ovocito. Se han demostrado tres mecanismos que guían al espermatozoide para que tenga lugar la fecundación: la termotaxis, la reotaxis y la quimiotaxis, donde los diferentes estímulos son el gradiente de temperatura, el flujo de fluido y un gradiente de concentración de una sustancia quimioatrayente, respectivamente (Eisenbach et al. 2006).

El comportamiento de respuesta de los espermatozoides a un gradiente espacial de temperatura se traduce en un descenso en la linealidad del nado del espermatozoide. Esto se refleja en los parámetros de motilidad (menor linealidad) y en el aumento del desplazamiento de la cabeza, lo que resulta en una mayor amplitud de movimiento del flagelo.

Además, cuando el espermatozoide siente un flujo de fluido, este es capaz de cambiar su dirección y nadar en contra del flujo (reotaxis). Asimismo, al nadar hacia un gradiente de concentración de una sustancia quimioatrayente, el espermatozoide es continuamente estimulado (Cerezales et al. 2015). La quimiotaxis espermática es un mecanismo muy extendido que guía el espermatozoide hacia el ovocito, tanto cuando la fecundación es externa como interna (Eisenbach et al. 2006). (Figura 2.2).

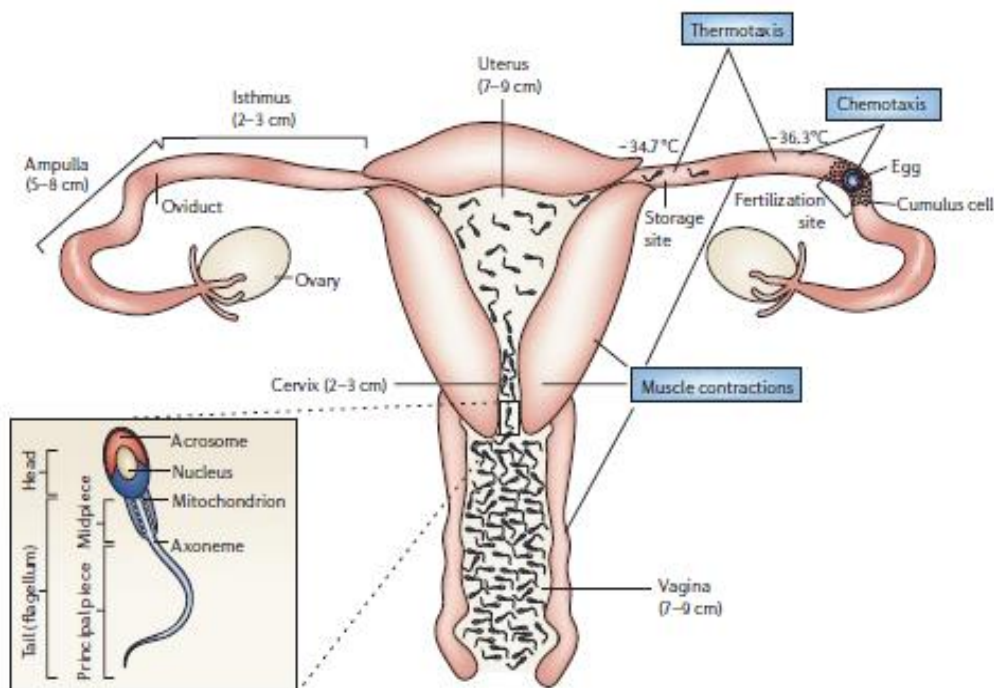


Figura. 2.2. Tracto reproductor femenino en mamíferos y posibles mecanismos de orientación de los espermatozoides.

En el caso de las especies de fecundación interna, los espermatozoides ascienden por la vagina gracias a dos mecanismos: nadar de forma activa, o de forma pasiva mediante las contracciones de la capa muscular del tracto genital de la hembra. Una vez en el oviducto, donde va a tener lugar la fecundación, una fracción de los espermatozoides es capacitada, lo que le permite llevar a cabo la posterior reacción acrosómica y la fecundación. Estos espermatozoides capacitados son guiados al lugar donde se encuentra el ovocito mediante una combinación de termotaxis y quimiotaxis.

Existe un gradiente de temperatura entre el sitio donde se depositan los espermatozoides (vagina y/o útero) y el sitio donde tiene lugar la fecundación (oviducto), lo que provoca un estímulo termotáctico. A su vez, las sustancias quimioatrayentes están presentes en el fluido del oviducto, y son secretadas también por el ovocito y las células del cúmulo que lo rodean (Eisenbach et al. 2006). Entre las sustancias confirmadas como quimioatrayentes para los espermatozoides de mamífero se encuentran el *atrial natriuretic peptide* (Ruskoaho et al. 1992), presente en el fluido folicular humano, y la progesterona (Teves et al. 2006).

Dado que las sustancias quimioatrayentes deben estar presentes en el fluido folicular, o ser secretadas por el ovocito o las células del cúmulo, la melatonina sería un buen candidato para ejercer una acción quimiotáctica sobre el espermatozoide ovino, ya que no solo está presente en el fluido folicular (Brzezinski et al. 1987), sino que estudios recientes han demostrado que las células del cúmulo ovinas tienen capacidad de síntesis de esta hormona (Casao et al. 2013).

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La melatonina es una sustancia presente en una gran diversidad de organismos, siendo una de sus funciones regular el fotoperiodo en las especies estacionales, como la ovina (Malpaux et al. 1997). Además, puede actuar directamente sobre el espermatozoide ovino, ejerciendo una acción antiapoptótica debido a su capacidad antioxidante (Casao et al. 2012) y modular la capacitación espermática, actuando a través de receptores de membrana MT₁ y MT₂ (Casao et al. 2012b; Gonzalez-Arto, 2014).

Por otro lado, se ha demostrado que la melatonina también tiene acción quimiotáctica en algunas células somáticas, como los leucocitos (Kvetnoy et al. 2002) y las células epiteliales de la retina (Shirakawa et al. 1987). Dado que la quimiotaxis es un proceso muy importante durante la fecundación, y que la melatonina está presente en el fluido folicular ovino (Brzezinski et al. 1987), y las células del cúmulus tienen capacidad de sintetizarla (Eisenbach et al. 2006), es posible que esta hormona intervenga en la interacción espermatozoide-ovocito.

Por tanto, los objetivos de este trabajo son:

1. Demostrar la capacidad quimioatrayente de la melatonina, utilizando diversas concentraciones de esta hormona en el proceso de selección espermática *in vitro*.
2. Determinar si la calidad espermática de la muestra seleccionada se ve aumentada por presencia de esta hormona en los medios de selección.
3. Investigar si los dos objetivos anteriores están afectados por la estación reproductiva en la que se obtiene la muestra seminal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Recolección de semen.

El semen fue recolectado de moruecos adultos, donados por la Asociación Nacional de Ganaderos de *Rasa Aragonesa* (ANGRA) y mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Las extracciones se realizaron en días alternos, mediante vagina artificial y se recolectaron dos eyaculados consecutivos por cada semental, utilizándose solo los segundos eyaculados (Ollero et al. 1996)

Para eliminar diferencias individuales, los segundos eyaculados de cada semental fueron mezclados entre sí y procesados conjuntamente (Ollero et al. 1996). Se mantuvieron a 37°C hasta el momento del procesamiento en el laboratorio.

Para determinar el efecto de la época reproductiva sobre los parámetros estudiados, las muestras seminales se recogieron tanto en estación reproductiva (Octubre-Febrero) como no reproductiva (Abril-Junio).

4.2. Selección espermática por el método de swim-up/dextrano.

Todos los reactivos, excepto los que se especifica, se adquirieron en Sigma-Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos).

El swim-up/dextrano es un método de separación celular que permite eliminar el plasma seminal y/o los restos celulares de los eyaculados ovinos, y seleccionar una población espermática con buena motilidad y viabilidad celular (Álvarez et al. 1993). El fundamento de este método consiste en aprovechar la habilidad de los espermatozoides de “nadar” hacia la superficie de un tubo, atravesando una capa intermedia de dextrano (Berger et al. 1985).

El medio utilizado para la reacción del swim-up es el mHTF (modified Human Tubular Fluid Medium), descrito por Quinn y col. (Quinn et al. 1985) y adaptado a la especie ovina. La composición final del medio fue la siguiente (Tabla 4.1):

Tabla 4.1. Composición del medio mHTF para el método de swim-up/dextrano.

SALES		AZÚCARES	
NaCl	50 mM	Hepes	21 mM
KCl	10 mM	Glucosa	2,8 mM
MgSO ₄ (anhidro)	0,4 mM	Piruvato sódico	0,3 mM
K ₂ HPO ₄	0,3 mM	Lactato sódico	18,6 mM
		Sacarosa	200 mM

El pH del medio se ajustó a 6,5, y se le añadieron 1,5 UI/ml de penicilina y 15 µg/ml de estreptomicina para evitar su contaminación.

El proceso de swim-up que se llevó a cabo es el siguiente: 0,5 ml de semen son colocados en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro, y sobre la muestra de semen se depositó una capa de 0,5 ml del medio mHTF-Dextrano (30 mg Dx/ml mHTF). Sobre la capa de dextrano se añadió una capa de 1,5 ml de mHTFA (5mg BSA/ml mHTF), que impide la adhesión de los espermatozoides entre sí y a las paredes del tubo. Esta capa final constituye el medio de recogida, donde se concentran los espermatozoides de buena motilidad y membrana intacta. (Figura 4.1). (García López et al. 1996).

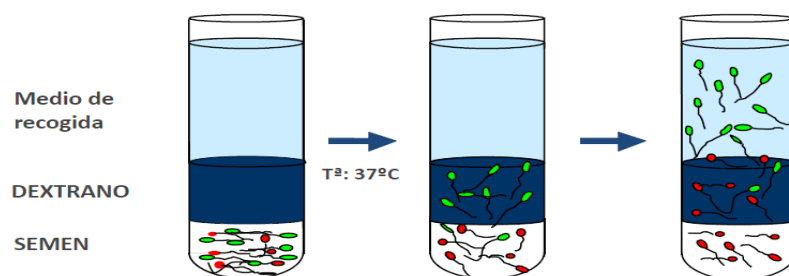


Figura. 4.1. Representación gráfica del fundamento del método de swim-up. Los espermatozoides no viables se representan de color rojo (al fondo del tubo y en la capa de dextrano), y los viables de color verde (en la capa superior de recogida).

Una vez formadas las 3 capas, el conjunto se dejó incubar a 37 °C durante 15 minutos; a continuación, se recogió 750 µl de la capa superior, que se designó como primer sobrenadante, y se añadió el mismo volumen de medio mHTFA. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas, obteniéndose un total de cuatro sobrenadantes. Se desechó el primero por contener restos del plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes (2,25 ml en total).

Para determinar el posible efecto quimiotáctico de la melatonina, a partir de cada muestra de semen se realizaron tres swim-up de forma simultánea:

- Swim-up control (S-up control), con DMSO 1/10.000 (v/v) en el medio de recogida, al ser el compuesto en el que se ha disuelto la melatonina.
- Swim-up con melatonina a una concentración de 1 µM en el medio de recogida (S-up Mel 10^{-6} M).
- Muestra swim-up con melatonina a una concentración de 100 pM en el medio de recogida (S-up Mel 10^{-10} M).

Las concentraciones de melatonina utilizadas en este trabajo son las mismas que en trabajos previos de nuestro grupo habían demostrado un efecto antiapoptótico y modulador de la capacitación del espermatozoide ovino (Casao et al. 2010b).

Una vez finalizados los swim-ups, las muestras seleccionadas se analizaron para determinar su calidad espermática. En los tres grupos experimentales se analizó:

- Concentración y porcentaje de recogida.
- Motilidad total y progresiva.
- Integridad de membrana (viabilidad).
- Estado de apoptosis evaluado mediante la inversión de fosfatidilserina.
- Estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC).
- Distribución del receptor MT₂ de melatonina, determina por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Por otro lado, y previamente a la realización de los swim-up, una muestra de semen inicial se diluyó 1/100 (v/v) en un medio salino (medio bifase, compuesto por sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, KOH 2 mM, Glucosa 5 mM, NaH₂PO₄ 0,5 M y HEPES 10 mM), y analizó del mismo modo que los tres swim-up (excepto el porcentaje de recogida).

4.3. Concentración y porcentaje de recogida.

La concentración espermática se determinó mediante una cámara de Neubauer en un microscopio Nikon eclipse 50i; (Nikon, Tokyo, Japan) con un objetivo 10x.

La muestra se diluyó 1/2.000 (v/v) en agua para semen fresco y 1/100 cuando se analizaron muestras seleccionadas mediante swim-up. Se colocó una gota de 6 µl de la dilución en la cámara de Neubauer y se contaron los espermatozoides de 16 cuadrículas de la cámara (4 en cada una de las esquinas), y la concentración se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = n^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times 1/\text{Dilución}$$

El porcentaje de recogida se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recogida} = 100 \times \frac{\text{Concentración swim-up} \times 3 \times 0,75 \text{ ml}}{\text{Concentración muestra inicial} \times 0,5 \text{ ml}}$$

4.4. Evaluación de la motilidad espermática.

La motilidad espermática se evaluó mediante un sistema de análisis computarizado CASA (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, España), con una cámara de video (Basler A312f; Basler Vision Components, Exton, PA) montada en un microscopio (Nikon eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japan), con una lente 10x de contraste de fase (Figura 4.2).

Para ello, se colocó una gota de 6 µl de cada muestra, a una concentración de 3×10^7 espermatozoides/ml, entre un porta y un cubreobjetos atemperados. Se analizaron 5 campos por gota. Los parámetros analizados fueron la motilidad total (el porcentaje de espermatozoides que se mueven), y la motilidad progresiva (el porcentaje de espermatozoides que se desplazan de forma recta).

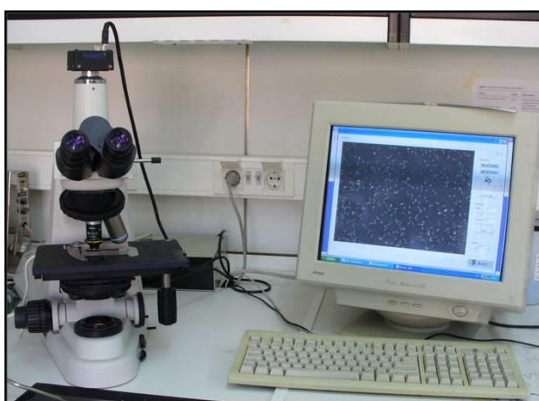


Figura. 4.2. Equipo usado para evaluar la motilidad espermática de forma automatizada con el programa ISAS.

4.5. Determinación de la viabilidad.

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó mediante una doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (CFDA/IP) que se evaluó por citometría de flujo.

Tanto la muestra de semen inicial como las muestras obtenidas tras swim-up se diluyeron hasta una concentración de 6×10^6 espermatozoides/ml en medio bifase, a la que se adicionaron 3 µl de formaldehído 0,5% (v/v), 3 µl de CFDA (0,46 mg/ml en DMSO), y 3 µl de yoduro de propidio (0,5 mg/ml en agua).

El CFDA atraviesa la membrana plasmática de los espermatozoides, y aquellos que tengan actividad enzimática lo hidrolizan a carboxifluoresceína (con fluorescencia verde), que al estar ionizada, no podrá atravesar la membrana plasmática si esta está intacta. De esta forma, los espermatozoides viables se observarán teñidos de verde. A su vez, el IP penetra en los

espermatozoides que tienen la membrana dañada. Este es un colorante nuclear, por lo que se une al DNA y por tanto, los espermatozoides no viables se observarán teñidos de rojo. (Harrison et al. 1990) (Figura 4.3).

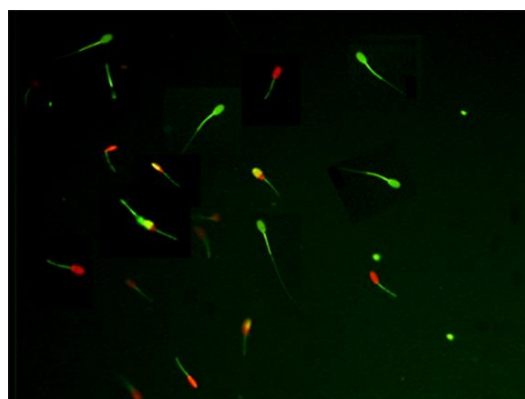


Figura. 4.3. Imagen representativa de la doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (CFDA/IP) evaluada con microscopio de fluorescencia. Se observan los espermatozoides viables en color verde y los no viables en rojo.

En nuestro caso, para llevar a cabo la determinación de la viabilidad se analizaron las muestras por citometría de flujo. El citómetro utilizado fue un Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, EEUU), con un software CXP, equipado con dos láseres (laser de ion Argon 488nm y laser de estado sólido 633nm) y cinco filtros de absorbancia (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675, y FL5-755; 65 nm cada filtro de paso de banda). Para la determinación de la viabilidad espermática se utilizaron los filtros FL1 y FL4. Se evaluaron 20.000 células (eventos) en todos los experimentos (Figura 4.4).

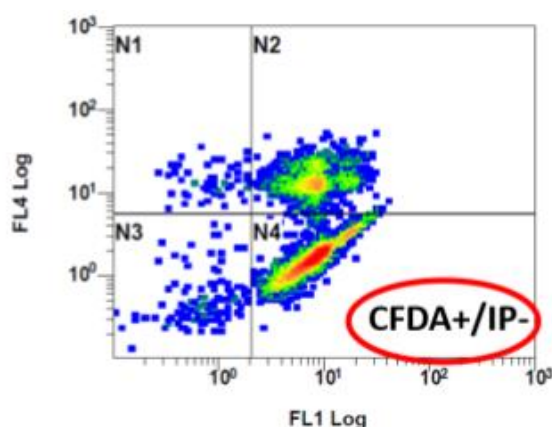


Figura. 4.4. Imagen representativa de las diferentes poblaciones celulares obtenidas mediante citometría de flujo con la doble tinción de diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (CFDA/IP). Los espermatozoides viables se observan en el cuadrante inferior derecho (CFDA+/IP-).

4.6. Evaluación del estado de apoptosis.

Para determinar el estado de apoptosis, se utilizó una doble tinción con FITC-Anexina V (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para detectar la translocación de fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática, y yoduro de propidio (IP), para diferenciar además las células con membrana intacta de aquellas con la membrana dañada.

Las distintas muestras se diluyeron para obtener una concentración final de 2×10^7 cel/ml y 10 μ l de cada dilución fueron incubadas a 37°C en 350 μ l de tampón de tinción (1X Binding Buffer), 1 μ l del reactivo FITC-Anexina V, 3 μ l de PI y 4 μ l de formaldehído al 0,5% (v/v).

Las muestras se evaluaron mediante citometría de flujo, que permitió distinguir cuatro subpoblaciones celulares: los eventos contados en el cuadrante inferior-izquierda se corresponden con las células no apoptóticas viables (membrana intacta); en cuadrante abajo-derecha están representadas las células que tienen la membrana intacta pero presentan translocación de PS (“early-apoptotic”); los eventos en el cuadrante arriba-derecha se corresponden con las células de membrana dañada y translocación de PS; por último, los eventos del cuadrante arriba-izquierda representan los espermatozoides muertos (figura 4.5).

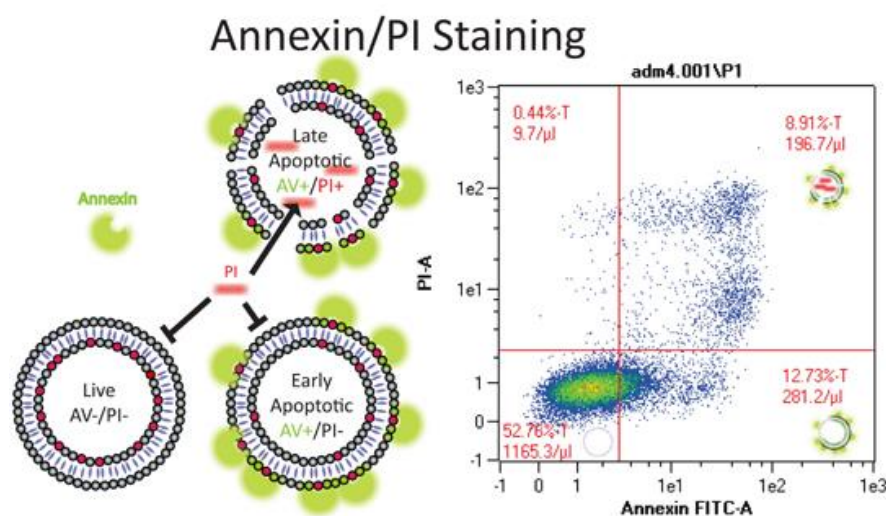


Figura. 4.5. Fundamento del método (izda.) e imagen de las diferentes poblaciones celulares obtenidas mediante citometría de flujo con la tinción FITC-Anexina V y yoduro de propidio (IP) (dcha).

4.7. Evaluación del estado de capacitación.

El estado de capacitación se evaluó mediante tinción con clorotetraciclina (CTC), antibiótico con el que se obtienen distintos patrones de fluorescencia en función de la concentración intracelular de calcio y su diferente compartimentalización.

Para realizar la tinción se mezclaron 18 μ l de cada muestra (concentración 3×10^7 células/ml) con 2 μ l de homodímero de etidio (ETDH₁, 23,3 μ M, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE.UU); se incubaron a 37 °C durante 10 minutos en oscuridad. Tras la incubación se añadieron 20 μ l de la solución con CTC (2mg CTC en 5ml de una solución tampón compuesta por Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5 μ M, pH 7,8), y 5 μ l de solución fijadora (1.25% p/v de paraformaldehído en tampón TRIS-HCl 0.5M), y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, 6 μ l de cada muestra se dispusieron en un portaobjetos y se le añadieron 2 μ l de trietilenodiamino 0.22 M (DABCO) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) para conservar la fluorescencia. Se colocó el cubreobjetos y se selló la muestra, siempre realizando los procesos protegidos de la luz.

Las muestras fueron evaluadas posteriormente mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E-400 con iluminación de epifluorescencia y un filtro V-2A. Se contaron 200 células de cada muestra y se obtuvieron los porcentajes de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados.

Los espermatozoides no capacitados presentan fluorescencia uniforme en toda la cabeza, mientras que los capacitados carecen de fluorescencia en la región postacrosomal; los espermatozoides reaccionados no presentan fluorescencia, o solamente una banda en la zona ecuatorial (Gillan et al. 1997) (Figura 4.6).

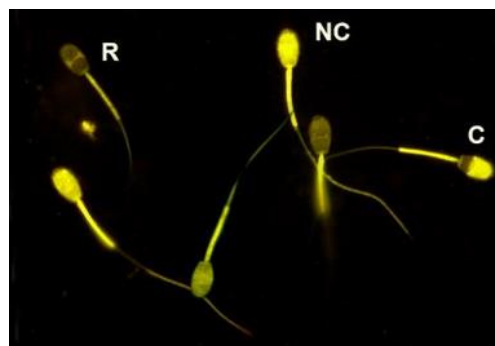


Figura. 4.6. Imagen representativa de la evaluación de la capacitación en espermatozoides ovinos mediante la tinción de clorotetraciclina, mediante microscopía de fluorescencia (1000 X). Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

4.8. Determinación de la distribución del receptor MT_2 de melatonina por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Dado que trabajos previos de nuestro grupo habían determinado una correlación entre el estado de capacitación espermática y la distribución del receptor de melatonina MT_2 en la membrana espermática (González-Arto et al., 2014), se decidió estudiar la distribución de este receptor entre los distintos grupos experimentales en el caso que se detectasen diferencias significativas en el estado de capacitación.

Para la IFI se partió de alícuotas de 4×10^6 espermatozoides/ml, que se fijaron con formaldehído 3.7% (v/v), diluido en un tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, y KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,2) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación en rueda.

Tras la incubación de las muestras, se centrifugaron durante 6 minutos a $900 \times g$, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en PBS. A continuación se depositaron 40 μ l de cada suspensión de células en portaobjetos polilisinados (Superfrost Plus) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 horas para asegurar una buena adhesión de las células. Una vez que las células estuvieron adheridas, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos.

Tras los lavados, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA al 5% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Tras volver a lavar las muestras, se adicionó el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo frente a MT_2 ; Acris Antibodies, Herford, Alemania) diluido 1:50 en PBS con BSA al 1% (v/v) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C para que se produjera la unión.

Al día siguiente, tras otros tres lavados, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario unido a un fluorocromo (Alexa Fluor 488 anti-conejo generado en pollo, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU), durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad; después de otros tres lavados, se montaron los portas con DABCO 0.22 M en solución de Glicerol:PBS, 9:1, para preservar la fluorescencia.

La determinación de la distribución del receptor MT_2 se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400 con iluminación de epifluorescencia y un filtro V-2A). Se contaron 200 células de cada muestra, y fueron evaluados los cambios de intensidad de la tinción en la

membrana de los espermatozoides de las distintas muestras (Figura 4.7). Se diferenciaron 3 inmunotipos: espermatozoides con la misma intensidad de tinción en acrosoma y postacrosoma, espermatozoides que presentaban una mayor intensidad de tinción en acrosoma que en postacrosoma, y finalmente, espermatozoides con una mayor intensidad de tinción en postacrosoma que en acrosoma.

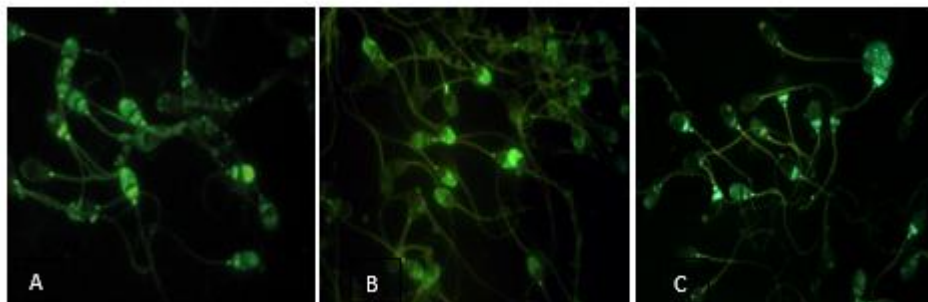


Figura. 4.7. Imágenes representativas de la distribución del receptor de melatonina MT₂, identificado mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluado mediante microscopía de fluorescencia. En la figura A, se observa la misma intensidad de tinción en acrosoma y postacrosoma; Mientras que se distingue una mayor intensidad de tinción en acrosoma y en postacrosoma en las figuras B y C, respectivamente.

4.9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa *GraphPad Prism 5*. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), en variables continuas que siguieron una distribución normal, mientras que en variables categóricas se utilizó un análisis de chi-cuadrado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ESTACIÓN REPRODUCTIVA (Octubre - Febrero)

5.1.1. Concentración y porcentaje de recogida.

Como se aprecia en la figura 5.1 y en la tabla 5.1, ninguna de las concentraciones de melatonina añadidas en el medio de recogida, en época reproductiva, mostró ningún efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides ovinos, no observándose diferencias significativas entre los grupos ni en concentración ni en el porcentaje de recogida.

Tabla 5.1. Concentración de espermatozoides, expresada en $n \times 10^8$ células/ml en las muestras swim-up control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M. Los resultados se muestran como media \pm EEM de 7 experimentos.

Concentración (10^8 espermatozoides/ml)		
S-up control	S-up Mel (10^{-6} M)	S-up Mel (10^{-10} M)
2,66 \pm 0,68	2,71 \pm 0,70	3,09 \pm 0,79

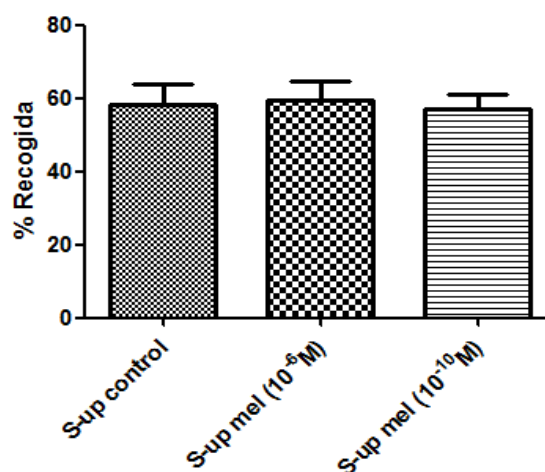


Figura 5.1. Porcentaje de espermatozoides recogidos tras los procesos de selección espermática por el método swim-up/dextrano, en los que se añadió al medio de recogida melatonina a una concentración 1 μ M (S-up mel (10^{-6} M)) o 100 pM (S-up mel (10^{-10} M)), o DMSO a una dilución 1/10000 (S-up control). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 7 experimentos.

Estos resultados podrían explicarse porque durante la estación reproductiva, los niveles de melatonina en el plasma seminal ovino son bastante altos, llegando a concentraciones incluso superiores a 1 μ M. Por ello, el gradiente de concentraciones entre el medio de recogida en los grupos tratados y de la muestra de semen depositado en el fondo del tubo de swim-up no sería suficiente para desencadenar un efecto quimioatractivo (Casao et al. 2010c).

5.1.2. Evaluación de la motilidad espermática.

Durante la estación reproductiva no se obtuvieron diferencias significativas ni en la motilidad total ni progresiva entre ninguno de los grupos experimentales entre sí ni con la muestra de semen inicial (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6}M y 10^{-10}M). Los resultados se muestran como media \pm EMM de 7 experimentos.

Motilidad (% espermatozoides móviles)				
	M. inicial	S-up control	S-up Mel (10^{-6}M)	S-up Mel (10^{-10}M)
Móviles totales	68,4 \pm 14,6	71,8 \pm 6,4	74,0 \pm 2,8	73,0 \pm 0,0
Móviles progresivos	30,4 \pm 11,0	24,3 \pm 5,0	25,3 \pm 10,1	16,0 \pm 6,0

La motilidad total apenas mejoró en ninguno de los grupos con respecto al semen recién eyaculado, lo que confirma la buena calidad seminal de la muestra de la que se parte, puesto que nos encontramos en estación reproductiva. Estudios previos en la especie ovina han demostrado que el porcentaje de mejora de la motilidad tras un proceso de swim-up depende de la motilidad de la muestra inicial, siendo mejor cuanto peor es esta (García-López et al. 1996), por lo que en muestras de buena motilidad, como las de estación reproductiva, la diferencia no será significativa, independientemente del tratamiento utilizado.

Por otro lado, la motilidad progresiva disminuyó, aunque no significativamente, tras el swim-up, sobre todo en el grupo tratado con dosis bajas de melatonina. Esta disminución de la motilidad progresiva podría estar relacionado con un aumento del porcentaje de espermatozoides hiperactivados en la muestra tratada con dosis bajas de esta hormona (Fujinoki 2008), ya que estudios previos en la especie ovina han determinado que esta dosis tiene cierto efecto capacitante (Casao et al. 2010b).

5.1.3. Determinación de la viabilidad.

Como se observa en la tabla 5.3, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad espermática entre ninguno de los grupos experimentales. Al igual que en el caso de la motilidad, al encontrarnos en estación reproductiva, la calidad seminal de la muestra inicial es buena, por lo que tras llevar a cabo el swim-up (con o sin melatonina), la viabilidad espermática apenas se ve incrementada (García-López et al. 1996). Además, y al contrario que sucede en otras especies (Du Plessis et al. 2010; Jang et al. 2010), la presencia de melatonina en los medios no parece afectar a la integridad de membrana espermática (Casao et al. 2010b).

Tabla 5.3. Porcentaje de espermatozoides viables en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6}M y 10^{-10}M). Los resultados se muestran como media \pm EMM de 6 experimentos.

Viabilidad (% espermatozoides viables)				
	M. inicial	S-up control	S-up Mel (10^{-6}M)	S-up Mel (10^{-10}M)
% Viabilidad	72,0 \pm 11,5	74,3 \pm 4,7	76,0 \pm 6,1	81,1 \pm 4,3

5.1.4. Evaluación del estado de apoptosis.

Para el estudio del nivel apoptótico tanto de la muestra inicial como de los distintos swim-up, se tomaron los espermatozoides que presentaban su membrana íntegra y sin traslocación de fosfatidilserina (viables sin traslocación de PS). Los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 5.2).

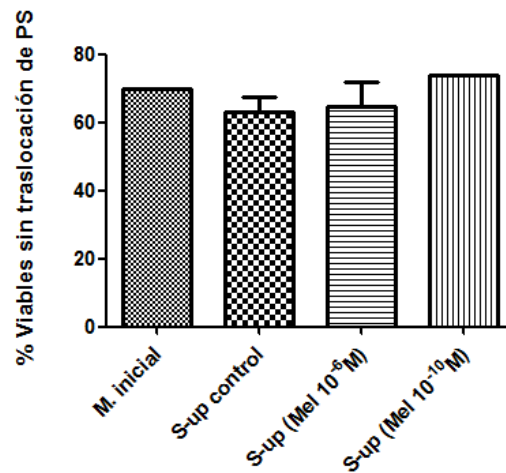


Figura 5.2. Porcentaje de espermatozoides viables que no presentan traslocación de fosfatidilserina en su membrana, en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 4 experimentos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los puntos anteriores, de tal manera que se confirma la buena calidad seminal inicial durante la estación reproductiva, y que se podría relacionar con los niveles altos de melatonina presentes de forma natural en el plasma seminal (Casao et al. 2010c), de tal modo que ni la selección espermática por swim-up ni la presencia de melatonina exógena en el medio parecen mejorarla.

5.1.5. Evaluación del estado de capacitación.

El análisis del estado de capacitación de las distintas muestras tampoco evidenció diferencias significativas (Figura 5.3.) entre los grupos experimentales ni con la muestra inicial. Se observó alto porcentaje de espermatozoides no capacitados en todas las muestras, lo que era de esperar, pues el proceso de capacitación espermática debe tener lugar en el tracto reproductor de la hembra para que pueda producirse la fecundación (Bedford et al. 1983), y un alto porcentaje de espermatozoides capacitados o reaccionados en el eyaculado reduciría las probabilidades de éxito.

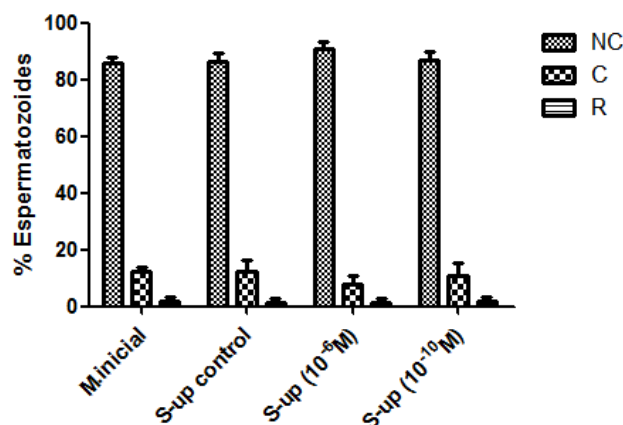


Figura 5.3. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R), en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 6 experimentos.

El hecho de no encontrar diferencias significativas entre la muestra control y las tratadas con melatonina podría deberse, como se ha comentado anteriormente, a la presencia de altos niveles de melatonina en el plasma seminal durante la estación reproductiva. Aun así, y a pesar de no haber obtenido diferencias significativas, la muestra seleccionada con una dosis alta de melatonina en el medio de recogida presentó un porcentaje ligeramente mayor de espermatozoides no capacitados, y un menor porcentaje de espermatozoides capacitados que el resto de los grupos experimentales, lo que concuerda con resultados previos en esta especie (Casao et al. 2010b).

5.2. ESTACIÓN NO REPRODUCTIVA (Abril - Junio)

5.2.1. Concentración y porcentaje de recogida.

La concentración (Tabla 5.4) no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos.

Tabla 5.4. Concentración de espermatozoides, expresada en $n \times 10^8$ células/ml en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 5 experimentos.

Concentración (10^8 espermatozoides/ml)		
S-up control	S-up Mel (10^{-6} M)	S-up Mel (10^{-10} M)
$1,86 \pm 0,72$	$2,31 \pm 0,63$	$2,06 \pm 0,82$

Sin embargo, como se aprecia en la figura 5.4, sí se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de recogida de las muestras seleccionadas en presencia de melatonina con respecto al control ($P < 0.001$).

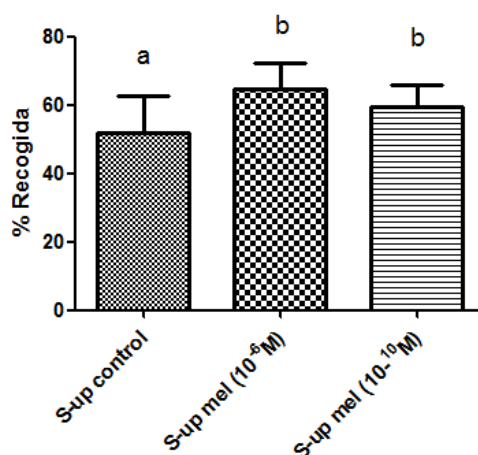


Figura 5.4. Porcentaje de espermatozoides recogidos tras los procesos de selección espermática por el método swim-up/dextrano, en los que se añadió al medio de recogida melatonina a una concentración $1 \mu\text{M}$ (S-up mel (10^{-6} M)) o 100 pM (S-up mel (10^{-10} M)), o DMSO a una dilución 1/10000 (S-up control). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 5 experimentos. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

Estos resultados indicarían que existe cierta quimioatracción por parte de los espermatozoides hacia la melatonina añadida en el medio de recogida. El hecho de que en estación no reproductiva estas diferencias sean significativas podría deberse a que los niveles de melatonina en el plasma seminal en esta época son bastante bajos (Casao et al. 2010c) por lo que el gradiente de concentración establecido al añadir melatonina al medio de recogida sería el suficiente para ejercer un efecto quimioatrayente.

Estudios previos ya habían demostrado que la melatonina es una sustancia quimiotáctica para las células del sistema inmune, en concreto para los leucocitos (Peña et al. 2007). Por otro lado, los espermatozoides son células que se guían por quimioatracción, entre otros mecanismos, para alcanzar el ovocito en el oviducto de la hembra, y la melatonina podría estar presente en el fluido oviductal (Eisenbach et al. 2006). Por ello, se podría proponer la melatonina como una posible sustancia quimiotáctica para los espermatozoides ovinos dentro del tracto reproductor de la hembra.

5.2.2. Evaluación de la motilidad espermática.

La motilidad espermática no varió significativamente (Tabla 5.5) entre los distintos grupos. Estos resultados concuerdan con los estudios llevados a cabo anteriormente por el grupo de investigación, donde tampoco se encontraron diferencias significativas en la motilidad al incubarse con diferentes concentraciones de melatonina (Casao et al. 2010b).

Tabla 5.5. Porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EMM de 5 experimentos.

Motilidad (% espermatozoides móviles)				
	M. inicial	S-up control	S-up Mel (10^{-6} M)	S-up Mel (10^{-10} M)
Móviles totales	80,4 \pm 5,4	85,8 \pm 10,2	89 \pm 10,5	90,4 \pm 8,1
Móviles progresivos	34,2 \pm 3,4	24,4 \pm 13,2	23,2 \pm 8,2	29,2 \pm 12,2

5.2.3. Determinación de la viabilidad.

Al igual que ocurría en los experimentos realizados en estación reproductiva, tampoco se encontraron diferencias significativas en la viabilidad entre los distintos grupos experimentales durante la estación no reproductiva (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Porcentaje de espermatozoides viables en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EMM de 4 experimentos.

Viabilidad (% espermatozoides viables)				
	M. inicial	S-up control	S-up Mel (10^{-6} M)	S-up Mel (10^{-10} M)
% Viabilidad	62,1 \pm 10,0	78,1 \pm 8,0	73,4 \pm 11,8	72,9 \pm 12,3

Como se ha comentado, estos resultados coinciden con los obtenidos por Casao et al. (2010b), en los que la incubación de espermatozoides ovinos con diferentes concentraciones de melatonina no influía en la integridad de la membrana espermática, y por tanto en la viabilidad de los espermatozoides, al contrario de lo que ocurre con espermatozoides de otras especies (Du Plessis et al. 2010; Jan et al. 2010).

5.2.4. Evaluación del estado de apoptosis.

Se observó un aumento de los porcentajes de espermatozoides viables sin traslocación de fosfatidilserina en todas las muestras seleccionadas por swim-up en estación no reproductiva, aunque no es estadísticamente significativo (Figura 5.5), lo que indicaría que este método de

selección, cuando la calidad espermática es peor permite seleccionar células no apoptóticas (Marti et al. 2006).

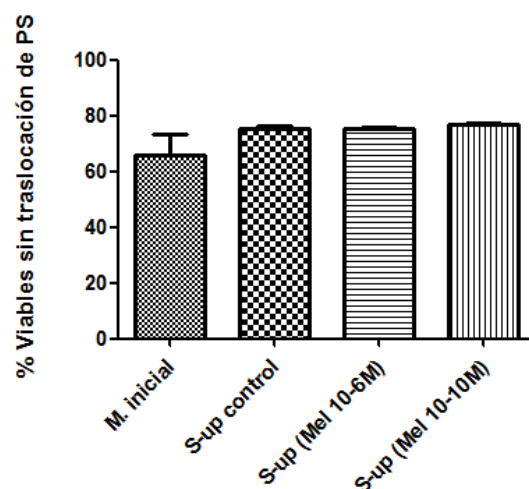


Figura 5.5. Porcentaje de espermatozoides viables sin traslocación de fosfatidilserina, en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EEM de 3 experimentos.

Por otra parte, si bien era de esperar un descenso de la traslocación de fosfatidilserina en la membrana espermática en las muestras seleccionadas en presencia de melatonina, los resultados revelaron la ausencia de efecto de la melatonina en estos grupos experimentales. Esto parece contradecir resultados previos en ovino (Casao et al. 2010b) y en otras especies (Balao da Silva et al. 2011; Espino et al. 2011), en las que la incubación de los espermatozoides con melatonina parece tener acciones antiapoptóticas; sin embargo, es posible que el corto tiempo en que se realiza el proceso de selección espermática no sea suficiente para observar este efecto.

5.2.5. Evaluación del estado de capacitación.

Durante la estación no reproductiva, el análisis del estado de capacitación mediante CTC reveló diferencias significativas la muestra seleccionada con una concentración baja de melatonina y el resto de los grupos experimentales (Figura 5.6).

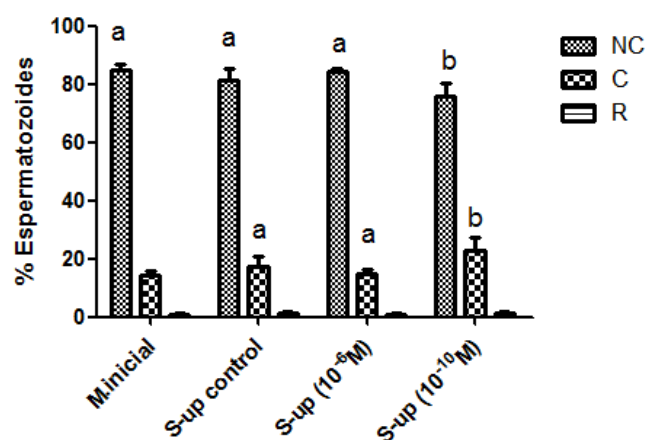


Figura 5.6. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R), en las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10^{-6} M y 10^{-10} M). Los resultados se muestran como media \pm EMM de 5 experimentos. Distintas letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).

En concreto, la muestra seleccionada con 100 pM de melatonina presentó un porcentaje significativamente inferior de espermatozoides no capacitados (NC) que la muestra inicial y el swim-up control ($P<0.05$), a la vez que aumentó el porcentaje de espermatozoides capacitados ($P<0.05$). Estas diferencias fueron todavía mayores ($P<0.01$) cuando se comparó con las muestras seleccionadas con dosis altas de melatonina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Casao et al. (2010b), en los que la tasa de capacitación espermática ovina se veía aumentada tras una incubación con melatonina a una concentración baja (100 pM).

5.2.6. Determinación de la distribución del receptor MT₂ de melatonina por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Dado que se habían observado diferencias significativas entre el estado de capacitación entre los distintos grupos experimentales, y que trabajos recientes han correlacionado el estado de capacitación del espermatozoide ovino con la distribución del receptor para melatonina MT₂ (González-Arto et al. 2014), decidimos estudiar la distribución de este receptor tanto en la muestra inicial como las seleccionadas por swim-up. . En muestras seleccionadas con la dosis baja de melatonina (Tabla 5.7), puede observarse una disminución del porcentaje de espermatozoides que presentan inmunoreactividad en el postacrosoma ($P<0.05$) con respecto a la muestra inicial, y que estudios previos correlacionan con el porcentaje de espermatozoides reaccionados. También se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con inmunoreactividad en el acrosoma entre las dos muestras seleccionadas con las diferentes concentraciones de melatonina ($P<0.05$). Este patrón correlaciona con el porcentaje de espermatozoides capacitados (González-Arto et al. 2014), y corresponde con los resultados obtenidos del análisis del estado de capacitación en este trabajo, por lo que este trabajo parece confirmar los obtenidos en ese estudio previo.

Tabla 5.7. Porcentaje de distintos patrones de intensidad en la distribución del receptor MT₂, evaluados mediante IFI, en espermatozoides de las muestras inicial y swim-up (control y con melatonina, 10⁻⁶M y 10⁻¹⁰M). Los resultados se muestran como media ± EEM de 2 experimentos.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)				
	M. inicial	S-up control	S-up Mel (10 ⁻⁶ M)	S-up Mel (10 ⁻¹⁰ M)
Acrosoma	26,5 ± 0,5	27 ± 0	21,5 ± 0,5 ^a	31,5 ± 2,5 ^b
Postacrosoma	6 ± 1 ^a	2,5 ± 0,5	5 ± 1	2 ± 0 ^b
Ambos	67,5 ± 1,5	70,5 ± 0,5	73,5 ± 1,5	66,5 ± 2,5

6. CONCLUSIONES

- La melatonina ejerce una acción quimiotáctica sobre los espermatozoides de ovino, obtenidos en época no reproductiva, incrementando de forma significativa el porcentaje de espermatozoides seleccionados mediante swim-up.
- La selección de espermatozoides utilizando medios con bajas concentraciones de melatonina (100 pM), de época no reproductiva, disminuye el porcentaje de espermatozoides no capacitados y modifica la distribución del receptor MT₂ sobre la superficie espermática, observándose una disminución en la inmunoreactividad en el postacrosoma de las muestras tratadas con 100 pM de la hormona. Ambos resultados están relacionados e indican que la acción de la melatonina podría ser mediada por estos receptores.
- Durante la estación reproductiva, no se observó ningún efecto quimioatrayente de la melatonina añadida a los medios de selección, ni tampoco sobre la calidad seminal de las muestras seleccionadas con respecto al semen inicial. Esto podría deberse a la buena calidad seminal de la muestra inicial, y a los altos niveles de melatonina en el plasma seminal existentes en la época reproductiva.

CONCLUSIONS

- Melatonin acts as a chemoattractant in ovine spermatozoa obtained during non-breeding season, increasing significantly the collected sperm rate by swim-up.
- Sperm selection using media with low melatonin concentration (100 pM) during non-breeding season, decreases the percentage of non-capacitated spermatozoa and modifies the MT₂ receptor distribution, showing a decrease in the immunoreactivity in postacrosome in samples treated with 100 pM melatonin. Both results are related and they suggest that this melatonin action could be receptor mediated.
- During breeding-season, any significant chemoattractive effect was observed in melatonin added to the media, nor seminal quality of selected samples in relation to initial sample. This lack of effect could be due to the good seminal quality of the initial sample, and the high levels of melatonin in seminal plasma during breeding-season.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." *Fertility and sterility*, **79**(4), 829-843.
- Álvarez, J. G., Lasso, J. L., Blasco, L., Nuñez, R. C., Heyner, S., Caballero, P. P., & Storey, B. T. (1993). "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime." *Human Reproduction*, **8**(7), 1087-1092.
- Avdi, M., Banos, G., Stefos, K., & Chemineau, P. (2004). "Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams." *Theriogenology*, **62**(1), 275-282.
- Balao da Silva, C. M., B. Macías-García, A. Miró-Morán, L. González-Fernández, A. Morillo-Rodriguez, C. Ortega-Ferrusola, J. M. Gallardo-Bolaños, G. Stilwell, J. A. Tapia and F. J. Peña (2011). "Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa." *Journal of Pineal Research* **51**(2): 172-179.
- Bedford, J. M. (1983). "Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals." *Biology of Reproduction*, **28**(1), 108-120.
- Berger, T., Marrs, R. P., & Moyer, D. L. (1985). "Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa." *Fertility and sterility*, **43**(2), 268-273.
- Boutin, J. A., Audinot, V., Ferry, G., & Delagrangue, P. (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." *Trends in pharmacological sciences*, **26**(8), 412-419.
- Brzezinski, A., M. M. Seibel, H. J. Lynch, M. H. Deng and R. J. Wurtman (1987). "Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **64**(4), 865-867.
- Casao, A., Luna, C., Serrano, E., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2009). "Quantification of melatonin and oxidized proteins and lipids in ram semen in breeding and non-breeding season." In *XXXIX Jornadas de Estudio, XIII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España, 12 y 13 de mayo de 2009*. (pp. 723-725). Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.
- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pé, R., Laviña, A., Quintín, F. J., & Muiño-Blanco, T. (2010a). "Effects of Melatonin Implants During Non-Breeding Season on Sperm Motility and Reproductive Parameters in Rasa Aragonesa Rams." *Reproduction in domestic animals*, **45**(3), 425-432.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F. & Muiño-Blanco, T. (2010b). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate". *Journal of pineal research*, **48**(1), 39-46.
- Casao, A., I. Cebrian, M. Asumpcao, R. Perez-Pé, J. Abecia, F. Forcada, J. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010c). "Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes." *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**(1): 59.
- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. Á. (2012a). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT₁ and MT₂ receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." *Reproduction, Fertility and Development*, **24**(7), 953-961.
- Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. Á. (2013). "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams". *Animal reproduction science*, **138**(3), 168-174.

Casao, A., Pérez-Pe, R., Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.Á., Muiño-Blanco, T. "Secreción de melatonina por las células del cúmulus ovinas y posible acción de esta hormona sobre los daños en el DNA durante la maduración *in vitro*." Comunicación oral. XV Jornadas sobre Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA). Publicación: ITEA. Volumen Extra Nº 1. (2013) 368-370. Zaragoza (España). 14-15 Mayo 2013.

Cebrian-Perez, J., Gonzalez-Arto, M., Luna, C., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., Abecia, A., & Casao, A. (2013, September). "Influence of capacitation state on MT1 and MT2 melatonin receptors in ram spermatozoa." In *Reproduction in domestic animals* **48** (pp), 75-75.

Cebrián-Pérez, J. A., Casao, A., González-Arto, M., Santos Hamilton, T. R., Pérez-Pe R., & Muiño-Blanco, T. (2014). "Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms". *Reproduction in Domestic Animals*, **49**(s4), 11-21.

Cerezales, S. P., Boryshpolets, S., & Eisenbach, M. (2015). "Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance." *Asian journal of andrology*.

Dubocovich, M., P. Delagrange and J. Olcese (2009). Melatonin receptors, IUPHAR database (IUPHAR-DB).

Du Plessis, S. S., K. Hagenaar and F. Lampiao (2010). "The *in vitro* effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS." *Andrologia* **42**(2): 112-116.

Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). "Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**(4), 276-285.

Espino, J., Á. Ortiz, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. García, A. B. Rodríguez and J. A. Pariente (2011). "Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways." *Fertility and Sterility* **95**(7): 2290-2296.

Fujinoki, M. (2008). "Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm." *Reproduction* **136**(5): 533-541.

Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." *International Journal of Developmental Biology*, **52**(5), 473.

García-López, N., Ollero, M., Muino-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (1996). "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." *Theriogenology*, **46**(1), 141-151.

Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. (1996). "Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa." *Reproduction, fertility, and development*, **9**(5), 481-487.

González-Arto, M., Luna, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A., & Casao, A. (2014). "New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality." *Reproduction, Fertility and Development*.

Harrison, R. A. P., & Vickers, S. E. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility*, **88**(1), 343-352.

Jang, H. Y., Y. H. Kim, B. W. Kim, I. C. Park, H. T. Cheong, J. T. Kim, C. K. Park, H. S. Kong, H. K. Lee and B. K. Yang (2010). "Ameliorative Effects of Melatonin against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress on Boar Sperm Characteristics and Subsequent In Vitro Embryo Development." *Reproduction in Domestic Animals* **45**(6): 943-950.

Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C., & Amarantidis, I. (2000). "Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece." *Small Ruminant Research*, **37**(1), 125-130.

- Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M. B., & Haliloglu, S. (2000). "Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams." *Revue de Médecine Vétérinaire*, **151**(12), 1143-1146.
- Kokolis, N., Theodosiadou, E., Tsantarliotou, M., Rekkas, C., Goulas, P., & Smokovitis, A. (2000). "The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram." *Andrologia*, **32**(2), 107-114.
- Kvetnoy, I. (2002). "Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness." *Neuro endocrinology letters*, **23**, 92-96.
- Malpoux, B., Viguié, C., Skinner, D. C., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." *Brain research bulletin*, **44**(4), 431-438.
- Malpoux, B., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." *Reproduction Nutrition Development*, **39**(3), 355-366.
- Marti, E., R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2006). "Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa." *Journal of andrology* **27**(6): 746-753.
- Misztal, T., Romanowicz, K., & Barcikowski, B. (2002). "Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season." *Animal reproduction science*, **69**(3), 187-198.
- Ollero, M., MuinoBlanco, T., LopezPerez, M. J. and CebrianPerez, J. A. (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." *International Journal of Andrology* **19**(5): 287-292.
- Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., & Rodríguez, A. B. (2011). "High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility." *Journal of pineal research*, **50**(2), 132-139.
- Palacín, I., Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A., Cebrián, J. Á., Muiño, T., ... & Pontes, J. M. (2009). "Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility." *Italian Journal of Animal Science*, **7**(2), 199-206.
- Peña, C., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., & Mosquera, J. (2007). "Chemotactic effect of melatonin on leukocytes." *Journal of pineal research*, **43**(3), 263-269.
- Quinn, P., Kerin, J. F., & Warnes, G. M. (1985). "Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid." *Fertility and sterility*, **44**(4), 493-498.
- Rao, M. V., & Gangadharan, B. (2008). "Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro." *Toxicology In Vitro*, **22**(4), 935-942.
- Reiter, R. J. (1993). "The melatonin rhythm: both a clock and a calendar." *Experientia*, **49**(8), 654-664.
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Manchester LC. (2013): "The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives." *Mini Rev Med Chem* **13**, 373–384.
- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2003). "Seasonality of reproduction in sheep." *Small Ruminant Research*, **48**(3), 155-171.
- Ruskoaho, H. (1992). "Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism." *Pharmacological reviews*, **44**(4), 479-602.

Sarabia, L., Maurer, I., & Bustos-Obregon, E. (2009). "Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA." *Ecotoxicology and environmental safety*, **72**(2), 663-668.

Sheikheldin, M. A., Howland, B. E., & Palmer, W. M. (1992). "Seasonal profiles of melatonin in adult rams." *Journal of pineal research*, **12**(2), 58-63.

Shirakawa, H., & Ogino, N. (1987). "Novel activity of melatonin. Its chemotactic effect on retinal pigment epithelial cells." *Ophthalmic research*, **19**(4), 226-229.

Shiu, S. Y. W., Li, L., Wong, J. T. Y., & Pang, S. F. (1997). "Biology of G protein-coupled melatonin receptors in the epididymis and prostate of mammals." *Chinese medical journal*, **110**(8), 647-655.

Sirotkin, A. V., & Schaeffer, H. J. (1997). "Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin." *Journal of Endocrinology*, **154**(1), 1-5.

Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M. & Reiter, R. J. (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." *Biological Reviews*, **85**(3), 607-623.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuna-Castroviejo, D., & Reiter, R. J. (2013). "Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes." *Journal of pineal research*, **54**(2), 127-138.

Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., & Giojalas, L. C. (2006). "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa." *Fertility and sterility*, **86**(3), 745-749.

Turek, F. W., Desjardins, C., & Menaker, M. (1976). "Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamsters." *Experimental Biology and Medicine*, **151**(3), 502-506.

van Vuuren, R. J., Pitout, M. J., van Aswegen, C. H., & Theron, J. J. (1992). "Putative melatonin receptor in human spermatozoa." *Clinical biochemistry*, **25**(2), 125-127.